

Please Click here to view the drawing

(19) KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

## KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 1020040096017 A  
 (43)Date of publication of application: 16.11.2004

(21)Application number: 1020030028811

(71)Applicant:

KOREA RESEARCH INSTITUTE  
OF BIOSCIENCE AND  
BIOTECHNOLOGY

(22)Date of filing: 07.05.2003

(72)Inventor:

KWAK, SANG SU  
KWON, SEOK YUN  
LEE, HAENG SUN  
PARK, SU YEONG

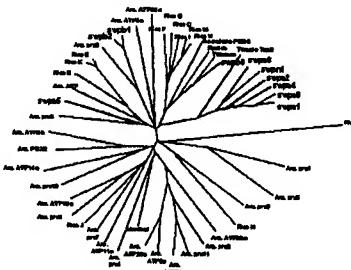
(51)Int. Cl

C12N 9 /08

(54) PEROXIDASE PROTEIN ORIGINATED FROM IPOMOEA BATATAS(SWEET POTATO) AND GENE ENCODING THE SAME PROTEIN, THEREBY DEVELOPING MULTIPLE STRESS-RESISTANCE PLANTS

(57) Abstract:

PURPOSE: A peroxidase protein originated from Ipomoea batatas (sweet potato) and a gene encoding the same protein are provided, which gene is expressed in a cultured sweet potato cell and various tissues, and its expression is induced by biological and non-biological stresses, so that it can be useful for development of multiple stress-resistance plants. CONSTITUTION: The peroxidase protein originated from Ipomoea batatas(sweet potato) has the amino acid sequence selected from SEQ ID NO:9 to SEQ ID NO:14, wherein the peroxidase protein is class III peroxidase protein, contains secretion signal peptide in the N-terminal, and preserves Arg-27 and His-42 as an active region. The gene encoding the peroxidase protein originated from Ipomoea batatas(sweet potato) has the nucleotide sequence selected from SEQ ID NO:3 to SEQ ID NO:8.



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(51) . Int. Cl.

*C12N 9/08* (2006.01)

(45) 공고일자

2006년07월06일

(11) 등록번호

10-0596653

(24) 등록일자

2006년06월27일

(21) 출원번호

10-2003-0028811

(65) 공개번호

10-2004-0096017

(22) 출원일자

2003년05월07일

(43) 공개일자

2004년11월16일

(73) 특허권자

한국생명공학연구원  
대전 유성구 어은동 52번지

(72) 발명자

곽상수  
대전광역시유성구전민동464-1엑스포아파트307-306

권석윤  
대전광역시유성구어은동99한빛아파트119-902

이행순  
대전광역시유성구어은동한빛아파트126-502

박수영  
인천광역시서구공촌동경남아파트101동1603호

(74) 대리인

이원희

심사관 : 조영균

**(54) 고구마 유래의 페옥시다제 단백질 및 이를 코딩하는 유전자**

요약:

본 발명은 고구마 유래의 페옥시다제 단백질에 관한 것으로, 보다 상세하게는 서열번호 9 내지 서열번호 14로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지는 고구마 유래 페옥시다제 단백질 및 이를 코딩하는 유전자에 관한 것이다. 본 발명의 페옥시다제 유전자는 고구마 배양세포 및 다양한 조직에서 발현하며, 생물학적, 비생물학적 스트레스에 의해 발현이 유도되기 때문에 이를 이용하여 복합스트레스 내성 식물체를 개발하는데 유용하게 이용할 수 있다.

내장도

도 2

영세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 고구마 유래 페옥시다제 유전자의 염기서열로부터 추론한 아미노산 서열을 비교한 그림이다.

B: 말단 헴 결합 부위(distal heme binding domain),

D: 중앙 보존 부위(central conserved domain) 및

F: 근위 헴 결합 부위(proximal heme binding domain)

도 2는 본 발명의 고구마 유래 페옥시다제 단백질의 아미노산 서열과 44개의 다른 식물 페옥시다제 아미노산 서열을 비교하여 유연관계를 나타낸 그림이다.

도 3a는 고구마의 여러 조직에서 본 발명의 고구마 유래 페옥시다제 유전자가 발현되는 양상을 확인한 RT-PCR 전기영동 사진이다.

L: 잎, S: 줄기, R: 뿌리, SR: 저장뿌리, Su: 혼탁배양세포

도 3b는 고구마 배양세포를 배양한 시간에 따른 본 발명의 고구마 유래 페옥시다제 유전자의 발현 양상을 확인한 RT-PCR 전기영동사진이다.

도 4a는 고구마 잎에 상처 스트레스를 준 후 12, 40 및 72시간째의 본 발명의 고구마 유래 페옥시다제 유전자 발현 양상을 나타낸 RT-PCR 전기영동 사진이다.

도 4b는 고구마 잎에 메틸 비올로젠을 처리한 후 12, 24 및 48시간째의 본 발명의 고구마 유래 페옥시다제 유전자 발현 양상을 나타낸 RT-PCR 전기영동 사진이다.

도 4c는 고구마 잎을 4°C로 저온 처리 및 37°C로 고온 처리한 후의 페옥시다제 유전자 발현 변화를 나타낸 RT-PCR 전기영동 사진이다.

도 4d는 고구마 잎을 과산화수소 및 염화나트륨으로 처리한 후의 페옥시다제 유전자 발현 변화를 나타낸 RT-PCR 전기영동 사진이다.

도 4e는 고구마 잎을 압세스산 및 자스몬산으로 처리한 후의 페옥시다제 유전자 발현 변화를 나타낸 RT-PCR 전기영동 사진이다.

도 5a는 여러 종류의 고구마 잎 절편에 무름병균을 감염시킨 후 시간에 따른 페옥시다제 활성을 나타낸 그래프이다.

도 5b는 여러 종류의 고구마 잎 절편에 무름병균을 감염시켰을 때의 페옥시다제 유전자 발현을 노던블롯 사진이다.

도 6은 본 발명의 고구마 유래 페옥시다제 유전자가 고구마의 계놈상에 존재하는 것을 확인한 서던블롯 사진이다.

**발명의 상세한 설명**

**발명의 목적**

**발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술**

본 발명은 고구마 유래의 페옥시다제 단백질 및 이를 코딩하는 유전자에 관한 것으로, 구체적으로는 고구마 유래의 산성 및 염기성의 페옥시다제 단백질 및 이를 코딩하는 유전자에 관한 것이다.

페옥시다제(peroxidase)는 과산화수소를 이용해 각종 기질(基質)을 산화시키는 반응을 촉매하는 효소로서 미생물을 비롯하여 동식물까지 광범위하게 존재한다. 페옥시다제는 반응 특이성 및 구조에 따라 클래스 I, 클래스 II 및 클래스 III로 분류된다(Hiraga *et al.*, *Plant Cell Physiol.*, 42, 462-468, 2001). 효모의 미토콘드리아 사이토クローム c 페옥시다제(mitochondria cytochrome c peroxidase), 엽록체(chlorophyl) 또는 세포질의 아스코베이트 페옥시다제(ascorbate

peroxidase) 등은 클래스 I에 속하며, 곱팡이의 분비형 페옥시다제(secretive peroxidase)는 클래스 II에 속한다. 클래스 III 페옥시다제는 세포외로 분비되거나 액포로 이동되며 대표적으로 서양고추냉이의 페옥시다제를 포함하는 식물의 페옥시다제가 포함된다. 클래스 III 식물 페옥시다제는 식물에서 보편적으로 발견되며, 많은 수의 아이소자임을 가지고 있다.

식물의 클래스 III 페옥시다제는 다양한 생리반응에 관여하는 것으로 알려져 있다. 즉, 목질화(lignification), 코르크질화(suberization), 세포벽 단백질의 결합, 오وك신 분해, 병원균 침입에 대한 방어, 염류장애에 대한 방어 및 노쇠과정 등에 관여하는 것으로 알려져 있다(Fry, *Annu Rev Plant Physiol*, 37, 165-186, 1986; Lagrimini et al., *Hort Sci*, 28, 218-221, 1993; Mohan et al., *Plant Mol Biol*, 21, 341-354, 1993; Zimmerlin et al., *Biochem J*, 299, 747-753, 1994). 또한, 식물의 클래스 III 페옥시다제는 식물의 발생, 생장 및 분화에 있어서 다양한 생리적 기능을 하는 것으로 알려져 있으며, 다양한 생물학적 스트레스(biotic stress) 및 비생물학적 스트레스(abiotic stress)에 의해 그 효소활성이 증대되는 것이 보고되어 이들 스트레스에 대한 식물체의 적응에 있어서도 중요한 역할을 할 것이라고 여겨진다. 그러나, 이들 효소에 대한 개개 아이소자임(isozyme)을 이용한 연구는 아직 부족한 실정이다.

페옥시다제는 활성산소종(슈퍼옥사이드 음이온 라디칼, 과산화수소, 하이드록실 라디칼, 일중항 산소)의 하나인 과산화수소를 제거하는 역할을 한다. 생체내에서 활성산소종의 농도는 매우 엄격하게 조절되고 있으나, 식물체가 다양한 환경스트레스(고온, 저온, 오존, 화학물질 등에 의한 비생물학적 스트레스 및 병원균, 바이러스, 곤충 등에 의한 생물학적 스트레스)에 직면하게 되면 활성산소종의 농도가 증가되어 산화 스트레스를 받게 된다. 이러한 산화 스트레스에 대한 방어기작으로 식물체는 비타민 C(ascorbic acid) 및 비타민 E(tocopherol) 등의 지분자 항산화물질과 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(superoxide dismutase, SOD), 카탈라제(catalae, CAT), 페옥시다제 등의 항산화효소로 구성된 항산화기구를 구비하고 있다.

지구 환경의 악화로 인해 식물체는 많은 환경스트레스를 받고 있는데, 페옥시다제 등의 항산화효소는 환경스트레스에 의해 과도하게 발생되는 활성산소종의 효율적인 제거에 이용될 수 있으며, 다양한 항산화효소 유전자가 도입된 형질전환 식물체는 산화스트레스 조건에서도 스트레스 내성을 갖고 있음이 밝혀졌다.

게놈정보가 완전히 밝혀진 아기장대(*Arabidopsis thaliana*)는 73개의 클래스 III 페옥시다제 유전자를 가지고 있는 것이 밝혀졌으며(Welinder et al., *Eur J Biochem*, 269, 6063-6081, 2002; Tognoli et al., *Gene*, 288, 129-138, 2002), 벼에서는 적어도 21개의 페옥시다제 유전자가 발현되고 있다(Hiraga et al., *FEBS Lett*, 471, 245-250, 2000).

본 발명자들은 고구마(*Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv White Star) 배양세포에는 적어도 30개 이상의 페옥시다제가 존재한다는 것을 활성염색으로 확인하였으며, 고구마 식물체로부터 유도한 배양세포를 이용한 페옥시다제 생산에 관하여 보고한 바 있다(대한민국 특허등록 제117516호; 한국생화학회지, 27, 132-137, 1994; *Phytochemistry*, 39, 981-984, 1995). 또한, 본 발명자들은 산성의 페옥시다제 유전자 3종과 중성의 페옥시다제 유전자 1종을 분리하여 이들 유전자들이 배양세포에서 특이적으로 발현되며 다양한 산화적 스트레스에 의해 발현이 유도되는 특성을 갖고 있음을 확인하였으며(Huh et al., *Mol Gen Genet*, 255, 382-391, 1997; Kim et al., *Mol Gen Genet*, 261, 941-947, 1999), 또한 이들 유전자를 이용한 페옥시다제의 대량생산에 관하여 보고한 바 있다(대한민국 특허등록 제176420호). 특히, swpa2 유전자의 게놈 DNA로부터 얻은 프로모터(SWPA2 promoter)는 과산화수소, 상처, 자외선 등에 의해 발현이 강하게 유도되며 배양세포에서 특이적으로 고발현하는 특성이 있어 산업적으로 이용가능성이 클 것으로 기대된다(대한민국 특허출원 제2000-61231호; PCT 출원 KR 00/01231호).

이에, 본 발명자들은 고구마 배양세포로부터 페옥시다제를 암호하는 신규 유전자를 대량으로 분리하여 이의 염기서열 및 아미노산 서열을 결정하였으며, 분리된 페옥시다제 유전자들이 고구마 배양세포에서 특이적으로 발현되는 것을 확인하였을 뿐만 아니라 다양한 화학적 스트레스, 물리적 스트레스 및 박테리아 감염에 의한 생물학적 스트레스에 의해 이들 유전자의 발현 양상이 다름을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

#### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 고구마 유래 페옥시다제 단백질 및 이를 코딩하는 유전자를 제공하는 것이다.

#### 발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 산성 또는 염기성의 고구마 유래 페옥시다제 단백질을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 페옥시다제 단백질을 코딩하는 고구마 유래 페옥시다제 유전자를 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 산성 또는 염기성의 고구마 유래 페옥시다제 단백질을 제공한다.

본 발명의 페옥시다제 단백질은 서열번호 9 내지 서열번호 14로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 한다.

본 발명의 페옥시다제 단백질은 모두 클래스 III 페옥시다제 단백질로 분류되며, 아미노산 서열 사이에는 서로 30 내지 80%의 상동성을 갖고 있고, N-말단에는 세포외로 분비되는데 관여한다고 알려진 분비신호 웹타이드를 포함하고 있으며, 페옥시다제 활성부위로 알려진 Arg-27 및 His-42가 보존되어 있다(도 1 및 표 2 참조).

또한, 본 발명의 페옥시다제 단백질의 아미노산 서열은 다른 식물에서 분리되어 보고된 44개의 페옥시다제 아미노산 서열과 비교하였을 때 특별한 유연관계가 확인되지 않는다(도 2 참조). 또한, 서열번호 9 내지 서열번호 11로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 단백질은 등전점(pI)이 각각 4.58, 5.68 및 5.07로 나타나 산성 단백질임을 알 수 있으며, 서열번호 12 내지 서열번호 14로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 단백질은 등전점이 각각 8.84, 9.93 및 9.57로 나타나 염기성 단백질임을 알 수 있다(표 1 참조).

또한, 본 발명은 상기 페옥시다제 단백질을 코딩하는 고구마 유래 페옥시다제 유전자를 제공한다.

본 발명의 유전자는 서열번호 9 내지 서열번호 14로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지는 단백질을 코딩하며, 서열번호 3 내지 서열번호 8로 구성된 군으로부터 선택되는 염기서열을 가지는 것이 바람직하다.

본 발명자들은 상기 서열번호 3 내지 서열번호 8로 기재되는 염기서열을 가지는 유전자를 각각 "swpa4", "swpa5", "swpa6", "swpb1", "swpb2" 및 "swpb3"라 명명하였다.

본 발명의 고구마 유래 페옥시다제를 코딩하는 유전자는 고구마의 게놈상에 존재하고(도 3 참조), 잎, 줄기, 뿌리, 저장뿌리와 같은 다양한 조직 및 혼탁배양세포에서 다양하게 발현되며(도 4a 참조), 배양세포의 배양시간이 증가함에 따라 유전자의 발현량이 거의 일정하거나 점차 증가하는 경향을 보인다(도 4b 참조).

또한, 본 발명의 고구마 유래 페옥시다제를 코딩하는 유전자는 상처(도 5a 참조), 활성산소(도 5b 참조), 고온 및 저온의 온도변화(도 5c 참조), 화학물질(도 5d 및 도 5e 참조)과 같은 비생물학적 스트레스에 의해 대부분 발현이 증가한다. 그리고, 무름병원인균과 같은 생물학적 스트레스에 의해 페옥시다제의 활성이 증가하고(도 6a 참조), 페옥시다제를 코딩하는 유전자의 발현도 또한 증가한다(도 6b 참조).

상기에서 살펴본 바와 같이, 고구마 배양세포로부터 분리된 서열번호 3 내지 서열번호 8로 기재되는 염기서열을 가지는 페옥시다제 유전자는 고구마 배양세포에서 특이적으로 강하게 발현하고, 다양한 스트레스 처리에 의해 발현이 유도되기 때문에 이 유전자 자체를 이용하거나, 유전자의 일부를 변형시킴으로써 환경 스트레스에 대한 적응성을 증대시키는 재료로 이용할 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

#### <실시예 1> 페옥시다제 유전자의 클로닝, 염기서열 분석, 유연관계 분석

배양한지 20일 된 고구마 혼탁배양 세포(대한민국 특허 등록 제176420호)로부터 mRNA를 분리하고, 역전사효소를 이용하여 mRNA로부터 cDNA를 합성한 후 이를 람다(lambda) ZAP II 벡터(Stratagene)에 삽입하여 cDNA 라이브러리를 제작하였다. 서열번호 1 및 서열번호 2로 기재되는 프라이머로 PCR을 수행하여 페옥시다제(peroxidase) 유전자를 스크리닝하기 위한 탐침 DNA를 제작하였다. 상기 제작된 탐침 DNA를 이용하여 통상의 방법으로 라이브러리를 스크리닝하여, 벡터에 삽입된 cDNA 절편의 크기가 1 kb 이상인 클론 218개를 확보하였다. 상기 클론으로부터 DNA를 분리하여 ABI 3700 염기서열결정기(PE Biosystems)로 삽입된 유전자의 5'-말단 염기서열을 결정하고 블라스트(Blast) 분석(<http://www.pdrc.re.kr>)을 수행하였다.

그 결과, 클론에 삽입된 DNA는 클래스 III 페옥시다제 유전자임을 확인하였다. 이 중 20개의 클론에 대하여 전체 염기서열을 결정하고, 염기서열로부터 아미노산 서열을 추론하였으며, 추론된 아미노산 서열을 기초로 성숙 단백질(mature protein)의 등전점(isoelectric point)에 따라 산성, 중성 및 염기성의 세 가지 그룹으로 구분하였다(ExPasy 프로그램 (<http://www.expasy.org/tools/>), PSORT 프로그램(<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp>)). 세 개의 그룹을 세분하여 산성의 페옥시다제 6 종류, 중성의 페옥시다제 6종류 및 염기성의 페옥시다제 8종류로 구분하였다. 상기 그룹으로부터 6개의 페옥시다제 유전자, 즉 산성 페옥시다제 유전자로 서열번호 3으로 기재되는 swpa4 유전자, 서열번호 4로 기재되는 swpa5 유전자, 서열번호 5로 기재되는 swpa6 유전자 및 염기성 페옥시다제 유전자로 서열번호 6으로 기재되는 swpb1 유전자, 서열번호 7로 기재되는 swpb2 유전자, 서열번호 8로 기재되는 swpb3 유전자를 확보하였다. 상기 서열번호 3 내지 서열번호 8로 기재되는 고구마 페옥시다제 유전자는 서로 다른 3'-말단 염기서열을 포함하는 등 서로 다른 특성을 가지고 있었다. 또한, 상기 서열번호 3 내지 서열번호 8로 기재되는 유전자 각각으로부터 코딩된 단백질은 서열번호 9 내지 서열번호 14로 기재되는 아미노산 서열을 가지고 있었다. 분리된 6 종류의 페옥시다제는 모두 클래스 III 페옥시다제로 분류되었으며, 아미노산 서열의 N-말단에는 세포외 분비에 관여한다고 알려진 분비신호를 포함하고 있었다(표 1 및 도 1). 도 1에서는 N-말단의 분비신호를 소문자 이탈릭체로 나타내었다.

[표 1]

페옥시다제 유전자	swpa4	swpa5	swpa6	swpb1	swpb2	swpb3
cDNA의 길이(bp)	1,283	1,390	1,284	1,257	1,263	1,290
5-UTR의 길이(bp)	36	40	37	59	60	47
3-UTR의 길이(bp)	157	330	165	164	166	260
추정되는 poly A 첨가신호 (poly A로부터의 거리, bp)	AATAAA (-68)	AAT(G)AAA (-21)	AATAAA (-24)	AATAA(T) (-119)	AATAAA (-122)	AATAAA (-17)
성숙단백질의 아미노산 수	335	304	334	310	314	297
단백질의 분자량	36.29	32.21	35.18	33.96	34.35	31.98
단백질의 등전점(pI)	4.58	5.68	5.07	8.84	9.33	9.57
분비신호의 길이 (아미노산 갯수)	21	23	20	23	23	24
분비여부	ER 막	분비	분비	분비	분비	분비

또한, 상기 서열번호 9 내지 서열번호 14로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 6개 페옥시다제 단백질간의 아미노산 서열 상동성을 조사한 결과, 30-80%의 상동성을 갖고 있었으며(표 2), 페옥시다제 활성부위로 알려진 Arg-27 및 His-42가 보존되어 있었다(도 1).

[표 2]

	swpa4 (356*)	swpa5 (327*)	swpa6 (354*)	swpb1 (333*)	swpb2 (337*)	swpb3 (321*)
swpa4						
swpa5	38					
swpa6	60	40				
swpb1	36	48	40			
swpb2	36	47	39	86		
swpb3	43	49	46	51	48	

상기에서 \*는 염기서열로부터 추론된 아미노산 개수를 의미한다.

또한, 고구마로부터 분리한 10종의 페옥시다제 단백질(swpa1, swpa2, swpa3, swpa4, swpa5, swpa6, swpb1, swpb2, swpb3) 및 애기장대와 벼 등에서 분리한 40여종의 페옥시다제 단백질 사이의 유연관계를 ClustalW 프로그램 (<http://plant.pdrc.re.kr/gene/align/clustalW.html>)를 이용하여 조사하였으나, 본 발명에서 분리한 페옥시다제 단백질과의 특별한 유연관계는 확인되지 않았다(도 2).

#### <실시예 2> 고구마 조직 및 세포의 배양시기에 따른 페옥시다제 유전자의 발현 변화 분석

고구마 혼탁배양 세포로부터 분리한 본 발명의 고구마 페옥시다제 유전자가 고구마의 조직 및 세포 배양 시기에 따라 발현하는 양상을 분석하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 통상의 방법으로 고구마 조직(잎, 줄기, 뿌리, 저장뿌리), 혼탁 배양 세포 및 배양한 시간별 혼탁배양세포(0.5, 5, 11, 14, 20, 30시간)로부터 총 RNA를 추출한 후 페옥시다제 유전자 특이적 프라이머를 사용하고 RT-PCR 커트(Gibco BRL)를 이용하여 페옥시다제 유전자의 발현 양상을 조사하였다. swpa4에 특이적인 프라이머로는 서열번호 15 및 서열번호 16으로 기재되는 프라이머, swpa5에 특이적인 프라이머로는 서열번호 17 및 서열번호 18로 기재되는 프라이머, swpa6에 특이적인 프라이머로는 서열번호 19 및 서열번호 20으로 기재되는 프라이머, swpb1에 특이적인 프라이머로는 서열번호 21 및 서열번호 22로 기재되는 프라이머, swpb2에 특이적인 프라이머로는 서열번호 23 및 서열번호 24로 기재되는 프라이머, swpb3에 특이적인 프라이머로는 서열번호 25 및 서열번호 26으로 기재되는 프라이머를 사용하였다.

그 결과, 분리한 6종의 페옥시다제 유전자는 모두 혼탁배양 세포에서 강하게 발현되었다. swpa4의 경우 고구마 식물체의 조직에서는 발현되지 않았으며, swpa6는 뿌리 및 줄기에서 강하게 발현하였고, swpb1은 고구마 뿌리 및 저장뿌리에서 강하게 발현하였으며, swpb3는 줄기에서 강하게 발현하였다(도 3a). 따라서, 고구마 혼탁배양세포에서 분리한 본 발명의 페옥시다제 유전자는 식물체의 조직에 따라 다양하게 발현함을 알 수 있었으며, 이는 각 조직에서 서로 다른 기능을 수행할 것임을 알 수 있었다.

또한, swpa4, swpa5, swpb2, swpb3는 혼탁배양하는 시간에 따라 발현이 증가되는 경향을 나타낸 반면, swpa6 및 swpb1은 배양 시간에 관계없이 항상 강한 발현을 나타내었다(도 3b). 따라서, 본 발명의 페옥시다제 유전자는 세포배양시기에 따라 서로 다르게 발현이 조절되고 있음을 알 수 있었다.

#### <실시예 3> 비생물학적 스트레스에 따른 페옥시다제 유전자의 발현 변화

본 발명의 페옥시다제 유전자가 비생물학적 스트레스에 대해 반응하는 정도를 분석하기 위해, 상처, 활성 산소종 생성 유도, 온도 및 화학물질과 같은 다양한 비생물학적 스트레스를 준 후 페옥시다제 유전자의 발현변화를 RT-PCR로 분석하였다.

먼저, 상처 스트레스를 주기 위해 온실에서 생육중인 고구마의 잎에 침봉으로 상처를 주고 12시간, 40시간, 72시간 후 통상의 방법으로 RNA를 분리한 후 상기 실시예 2에서 수행한 바와 같이 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, 상처처리 12시간 후부터 본 발명의 페옥시다제 유전자 6개 모두의 발현이 유도되기 시작하였으며, swpa6를 제외한 나머지 5개 유전자는 상처처리 72시간 후 최대의 발현을 나타내었다(도 4a).

다음으로, 활성 산소종(reactive oxygen species)을 생성하는 제초제인 메틸 비올로젠(methyl viologen, MV) 용액 50 μM을 고구마 식물체에 분무한 뒤 6시간, 12시간, 24시간 및 48시간 경과 후 잎으로부터 RNA를 분리하여 상기 실시예 2에 기재한 바와 동일하게 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, 본 발명의 페옥시다제 유전자는 모두 메틸 비올로젠에 반응하여 발현이 증가되었는데, 발현 유도 시간 및 강도가 서로 상이하게 나타났다. swpa5는 메틸 비올로젠 처리후 6시간만에 발현이 유도되어 가장 빨리 발현이 유도된 후 점차 발현이 감소되었으나, swpb3는 시간 경과에 따라 발현이 점차 증대되어 72시간 후 발현이 최대로 나타났다(도 4b).

그 다음으로, 온도 스트레스를 주기 위해 기내 배양중인 고구마 식물체를 48시간동안 4°C로 저온 처리 및 12시간 동안 37°C로 고온 처리한 뒤 통상의 방법으로 RNA를 분리하여 상기에서 실시한 바와 동일하게 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, swpa4는 저온 및 고온 처리에 의해 발현이 강하게 증가한 반면, swpa6는 온도 스트레스에 의한 발현 변화가 관찰되지 않았다. swpa5, swpb1, swpb2 및 swpb3은 고온 스트레스에 의해서만 발현이 증가하였다(도 4c). 따라서, 이러한 온도 스트레스에 대한 페옥시다제 유전자의 반응을 통해 본 발명의 페옥시다제 유전자는 고구마 식물체가 온도 스트레스에 대해 적응하는데 관여하고 있음을 알 수 있었다.

또한, 화학물질에 대한 페옥시다제 유전자의 발현변화를 조사하기 위해 상부로부터 세 번째의 잎(고구마의 엽병)을 과산화수소 440 mM, 염화나트륨 100 mM, 앰시스산 100  $\mu$ M 및 메틸자스몬산 100  $\mu$ M 농도로 각각 포함하는 용액 30 mL에 48시간동안 침지시켜 화학물질이 흡수되도록 처리하였다. 이때 과산화수소 및 염화나트륨에 대한 대조군으로는 멸균수를 사용하였으며, 앰시스산과 메틸자스몬산에 대한 대조군으로는 0.1% DMSO 용액을 사용하였다. 상기 처리후 통상의 방법으로 RNA를 분리한 후 상기에 기재된 방법과 같이 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, 과산화수소를 처리한 경우는 swpa4, swpb1, swpb2 및 swpb3의 발현이 강하게 유도되었으며, 염화나트륨을 처리한 경우는 swpa4의 발현이 강하게 유도되었다(도 4d). 앰시스산을 처리한 경우는 swpa4, swpb1, swpb2 및 swpb3의 발현이 유도되었으며, 메틸자스몬산을 처리한 경우는 swpa4, swpa5, swpb2 및 swpb3의 발현이 증가되었다(도 4e).

#### <실시예 4> 생물학적 스트레스에 따른 페옥시다제 유전자의 발현 변화

본 발명의 페옥시다제 유전자가 생물학적 스트레스에 대해 반응하는 정도를 분석하기 위해, 무름병원균을 감염시킨 후 페옥시다제 유전자의 발현변화를 RT-PCR로 분석하였다. 무름병의 원인균인 텍토박테리움 크리산테미(*Pectobacterium chrysanthemi*, KCTC 2569)를  $10^4$  세포수/mL이 되도록 희석한 후 온실에서 재배 중인 4 품종의 고구마(신황미, 화이트 스타, 율미, 자미)의 직경 18 mm의 잎 절편에 접종하였다. 상기 접종 후 12, 16, 20, 24 및 36시간째에 잎 절편을 회수하여 총 페옥시다제 활성 및 노던블롯 분석을 수행하였다. 페옥시다제의 활성은 피로갈률을 기질로 사용하여 시그마(Sigma)사의 방법에 따라 측정하였다(대한민국 특허등록 제117516호; 한국생화학회지, 27, 132-137, 1994; *Phytochemistry*, 39, 981-984, 1995). 또한, 노던블롯 분석은 상기 RT-PCR을 수행함으로써 증폭된 PCR 밴드로부터 추출한 DNA를 탐침자로 사용하여 통상의 방법으로 수행하였다.

총 페옥시다제 활성을 측정한 결과, 신황미 및 화이트 스타 잎 절편의 페옥시다제 활성은 감염 후 24시간에 최고에 이르렀다가 감소하는 경향을 보인 반면, 자미 및 율미 잎 절편의 페옥시다제 활성은 36시간까지 점차 증가하였다(도 5a). 또한, 페옥시다제 유전자의 발현량을 분석한 노던블롯 분석에서도 상기와 동일한 결과를 나타내었는데, 6개 페옥시다제 유전자의 발현은 병원균 접종에 의해 증가되었고, 특히 swpa4는 다른 페옥시다제보다 매우 강하게 발현이 유도되었다(도 5b). 따라서, 일부 페옥시다제가 병발생과정에 관여한다는 것을 알 수 있으며, 특히 swpa4의 프로모터는 병발생 과정에서 관련 유전자의 발현에 대한 연구와 병저항성 식물체의 개발에 이용될 수 있음을 알 수 있었다.

#### <실시예 5> 페옥시다제 유전자의 썬던 블롯 분석

본 발명의 페옥시다제 유전자가 고구마 게놈(genome)내에 존재하는 유전자임을 확인하기 위하여 썬던 블롯 분석(Southern blot analysis)을 실시하였다. 통상의 방법으로 고구마 배양세포로부터 게놈 DNA를 분리, 정제한 후 *EcoRI*, *HincII* 및 *HindIII*로 절단하였다. 제한효소로 절단된 게놈 DNA를 전기영동한 후 각 페옥시다제 유전자의 서로 다른 3'-말단 염기서열인 상기 실시예 4의 노던블롯 분석에서 사용한 탐침자를 이용하여 썬던 블롯 분석을 수행하였다.

그 결과, 각 페옥시다제 유전자는 서로 다른 제한효소로 절단하였을 때 절단되는 패턴이 달랐으며, 탐침자가 인식하는 벤드가 2개 이상 존재하여 본 발명의 페옥시다제 유전자는 게놈내에 복수로 존재하고 있음을 알 수 있었다(도 6).

#### 발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 고구마 유래 페옥시다제 단백질을 코딩하는 유전자는 고구마 배양세포 및 다양한 조직에서 발현하며, 생물학적, 비생물학적 스트레스에 의해 발현이 유도되기 때문에 이를 이용하면 복합스트레스에 대해 내성을 가지는 식물체를 개발하는데 유용하게 이용할 수 있다.

#### (57) 청구의 범위

##### 청구항 1.

서열번호 9로 기재되는 아미노산 서열로 이루어진 고구마 유래 페옥시다제 단백질.

##### 청구항 2.

제 1항의 피옥시다제 단백질을 코딩하는 유전자.

**청구항 3.**

제 2항에 있어서, 서열번호 3으로 기재되는 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 유전자.

**청구항 4.**

삭제

**청구항 5.**

삭제

**청구항 6.**

삭제

**청구항 7.**

삭제

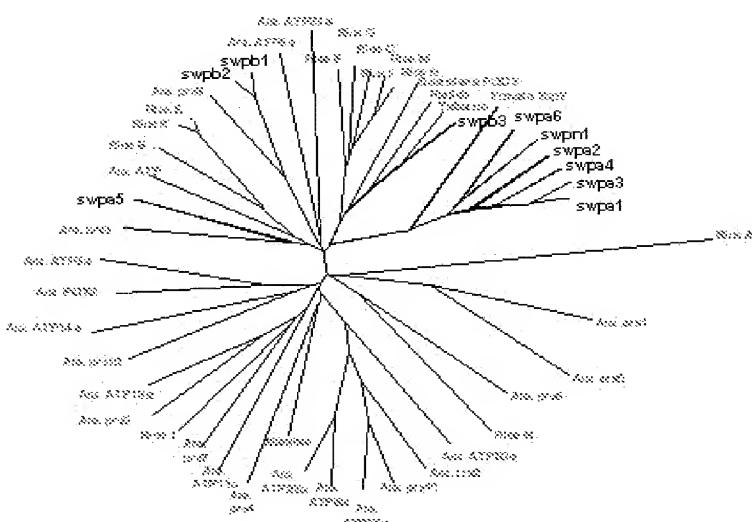
**청구항 8.**

삭제

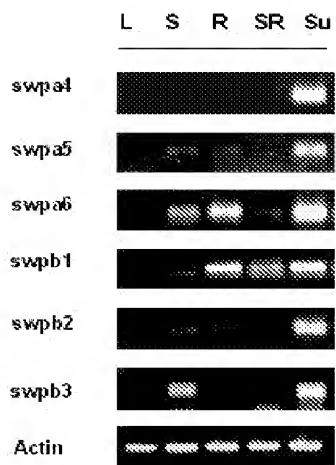
도면

三

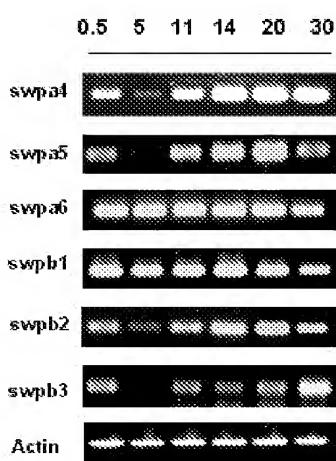
卷之三



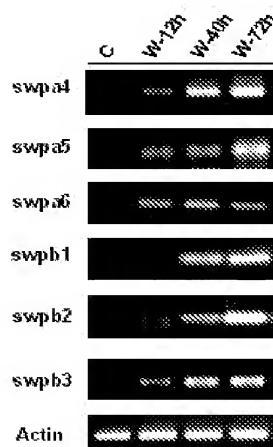
도면3a



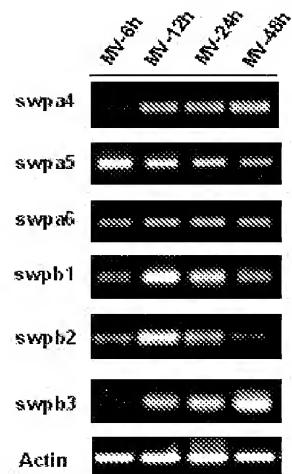
도면3b



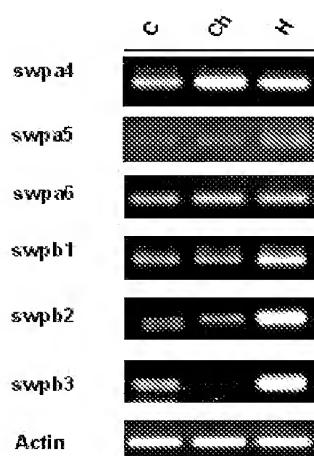
도면4a



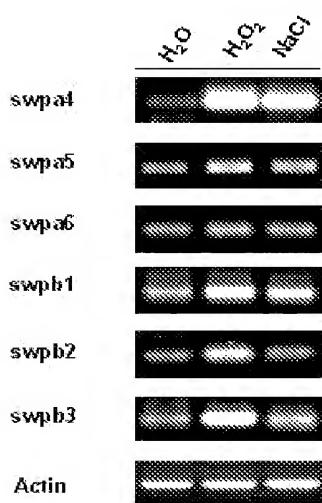
도면4b



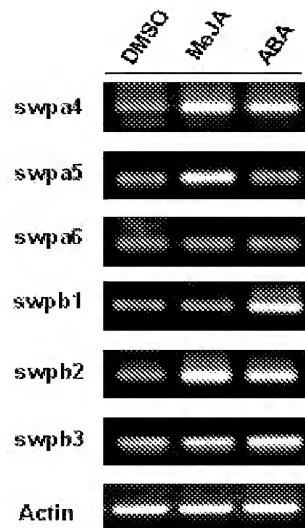
도면4c



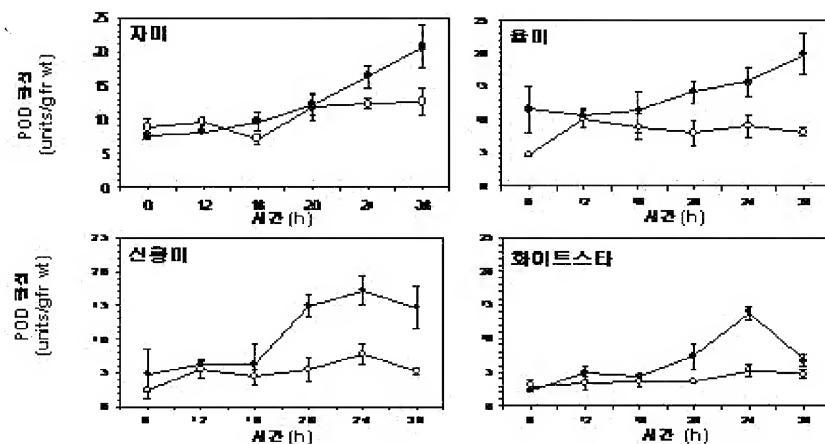
도면4d



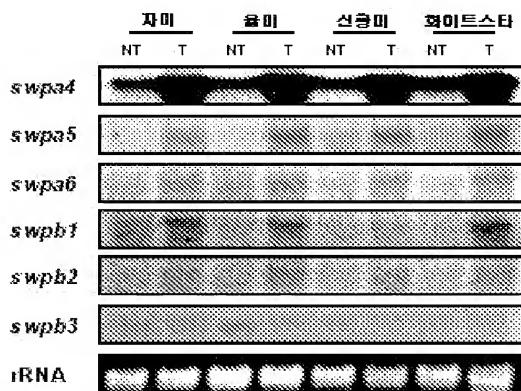
도면4e



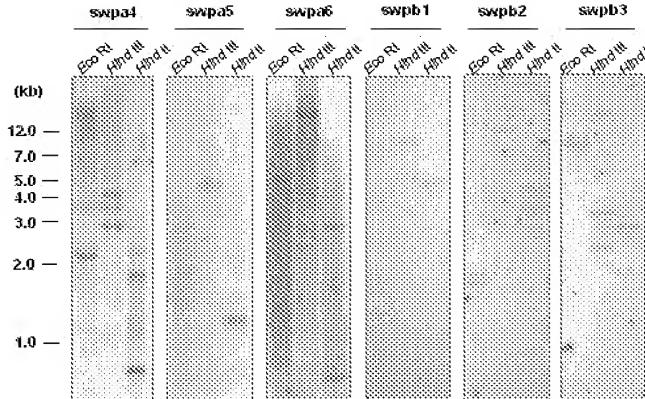
도면5a



도면5b



도면 6



## 서 6

<110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology  
 <120> Peroxidase protein originated from Ipomoea batatas and gene  
 coding the same  
 <130> 3p-04-26  
 <160> 26  
 <170> KopatentIn 1.71  
 <210> 1  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> forward primer for peroxidase gene of Ipomoea batatas  
 <400> 1  
 cacttccacg actgcttcgt 20  
 <210> 2  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> reverse primer for peroxidase gene of Ipomoea batatas  
 <400> 2  
 acgaaggca gtggaaagt 20  
 <210> 3  
 <211> 1283  
 <212> DNA  
 <213> Ipomoea batatas  
 <400> 3  
 cttcttcata cttcccttgc tgtgataatc atcatcatgg cttccttgc cactcggtcc 60  
 agcctggccc ttagcttcat cgccctagcc cttagctggct tctccattta ccagaataacc 120  
 catacagcca tgaaaggca gcttaagtc accccaaagt ggctgctaga caacactcta 180  
 gagtcgtcag tggccgacgt gctctcaacta cgccctaggca tctcctccgg aaagcttcc 240  
 gacgaagact gcatattctc cgccgttaag gaagtggtgg acgccccat tgatgcagaa 300  
 acccgcatgg gtgcttccct cattcgccctc ttcttccatg actggtttgt tgatggttgt 360  
 gacgcaggc ttctactaaa cgatacacct acttcacgc gagaacagac cgccggcggc 420

aataataact	cagtcacagg	tttgagggtg	atacaacaag	ctaaagagaa	tgtgataacc	480
aatgtccct	acatacaagt	atcttgtcc	gacatcttat	ccattgctgc	ccgtgattct	540
ttccagagat	ttactggaga	aacgtacacc	gtgactctgg	gaagactcga	tgcaagaacg	600
gcgaacctta	ccggagctaa	cacccaactc	gtcgaccaa	acgaggaatt	ggcatcgcaa	660
gtcgagaaat	ttgcggcgaa	agggttctcc	gaaacggagc	tagtcgcctt	gttaggtgtt	720
cacacggttg	ggttttcgag	atgtccgcctt	ttatgcgttc	ccatttcat	caatccgc	780
cgggcctcca	cgctgcaatg	caactgtccg	gtgagtcgg	acgacaccgg	gctgggtggc	840
ctggacccca	ctccgttgac	gtggaccaa	agttttact	ccgacgtggc	taacggtcaa	900
gggcttctgt	tctccgacaa	cgagctgatg	aatagcaaca	ccaccagcgc	cgccgtttagg	960
aggtacaggg	acgagatgga	cgctttctc	gccgatttcg	ccgcccctat	ggtgaagatg	1020
agcctctgc	cgccgtcccc	cggagtggag	ctcgaaatcc	gagaggtttg	cagcgagggt	1080
aatgccaaca	cagttgcac	catgtgaagt	tcgtcccat	cgacatcaat	aacgtctgt	1140
attctgtgaa	agttttactc	ggactgtgaa	gaattttcac	tttctgttgt	ttctgaaata	1200
aaaaagattt	ttttttatg	tcctaacaaa	acttgtatta	ctgaataaaaa	tttataaaatt	1260
tgttaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaa				1283
<210>	4					
<211>	1390					
<212>	DNA					
<213>	Ipomoea batatas					
<400>	4					
attaattacc	caataataaa	tcaccaaaaag	cccaacaaaaa	atggcttctt	tttcttcct	60
ttagccatg	gcactcgcca	tttccatctt	cttatctcac	tcaaatgctc	agctaagatc	120
cacttttac	tccaccacgt	gccctaacgt	gtcctcaatc	gttagcactg	tgattcaaca	180
ggccttgcag	aacgatgccc	gcattgggc	cagcctcatt	cgccctccatt	ttcacgactg	240
cttcgttaat	gggtgtatg	gttcaattt	gtagataac	aatggacaa	caattgtcag	300
tgagaaagat	gctgccccaa	acaataactc	cgctaggggt	ttcgtatgtt	ttgacaacat	360
taagaccgct	gttgagaatg	cctgtccgg	tgtcgttct	tgtgctgata	ttttagctct	420
ggcttccgaa	tctgcagttt	ctttggctag	tggccttca	tggaatgtgt	tgttagggag	480
aagagacagc	agaacagcaa	accaagcagg	agctaacact	agcattcctg	ctccctttga	540
aagcttaagc	aacattacca	caaagtttc	aaacgttgg	ttgaatgtt	atgatcttgc	600
ggcattatct	ggtgctcata	ccttggacg	cgcacaatgt	cgtacattt	gcaaccgggt	660
attcaactt	agcaacacgg	gcaatcctga	ttcccacott	aaacacaacc	tacttagcac	720
tttacaacaa	gtttgtccac	agggcgggtc	tggatcaacc	gtgaccaacc	ttgacccgac	780
aaccccgagac	accttcgaca	gcagttat	ctcaaatttg	cagaacaacc	gtgggcttct	840
gcaatcagat	caggagtgt	tctcaacatc	tgggctgca	accattgcca	ttgtcaacag	900
tttcagtgca	aaccaaactg	ccttcttca	gagtttgc	caatccatga	tcaatatgg	960
aaacatttagc	cccttaactg	ggaccagtgg	agagattagg	ttaaactgta	ggagacctaa	1020
ttgagggaaa	ttttgtcact	cctactatta	cctgcctg	tctgtatgtt	ttgtctttc	1080
acagattatt	tatcctttt	gccttttgg	tgtgtcttaa	ggctatttt	ttgctccgt	1140
agtgaardt	gttaggaatt	agttgtcaa	accaactaat	acaatcagtt	agtaactatc	1200
agttatttagc	tgattgccaa	acactttcta	taatagtttg	taatttttt	ctctcatgt	1260
ctagaacata	cactgtacat	gtcagctgt	gtgtatttt	ttttatttc	agtagctcat	1320
tttttaatg	aaaaagttt	attatattgt	ttcaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1380
aaaaaaaaaa						1390
<210>	5					
<211>	1284					
<212>	DNA					
<213>	Ipomoea batatas					
<400>	5					
cttcttccttc	tctcatacttc	tctcttagca	ttacatcatg	gcttcttcg	caacaaagct	60
cagtcttgc	ctgagcttgc	tggctctgt	cctagctggc	tactctat	accagaacac	120
ttactcagcc	attaatggca	ctgagctca	gcttatccca	acatggctgg	atgaaacatt	180

agagtcagcc	aacattctaa	gggctctagg	tttgggtaaa	tcatcgccg	gcatgcttc	240
cgacgaagcc	tgcggttct	ccgcgtttaa	agaaattgtg	gaagctgcc	ttactaatga	300
aacacgaatg	ggagcttctc	tcattcgct	cttcttccat	gactgcttcg	tgcacggttg	360
cgatggaggg	attcttctaa	atgccactaa	tggggagcaa	agtgcctcg	ccaatgctaa	420
ctcggttagg	gttttgaag	tgattgagcg	ggccaaacaa	aacgcgaaat	ctaagtgttc	480
agacacacac	gtatcttgt	cagatgtctt	agctattgt	gctcggtact	cggttgtaa	540
gctgggaggt	caaaccata	ctgtgaactt	ggggagaaga	gatgcaagat	cttcaacct	600
caccggagca	aataaccaac	ttccggcgcc	gttcgatgac	ctggcaacac	aaacacggaa	660
tttcgcccac	aagggttta	accaaacgga	gatgggtggcg	ttggccggag	cgcacacgggt	720
ggggttcgt	aggtgcgcgg	ttttgtcag	cagaataaac	cttaaccaag	ccagaaactc	780
gacgctgcag	tgcacctgcc	ccgtggcagc	gggagacgcg	ggtctggtcg	ggctggaccc	840
cacaccaagc	accatggaca	cgcgttattt	ccggacata	gtcgacggtc	aaggcctcct	900
tttctcgac	caagtgtgt	tgaacggac	gaccaccacc	gccgcccgtga	ggagataccg	960
gjacggcacc	ggcgcttcc	tctccgactt	cgcgcgcgc	atggtcaaga	tggcaacct	1020
gctccgtcc	gccgcgtcc	agctcgaaat	ccgcgacgtt	tgcagcatcg	tgaatcccac	1080
ttccgtggct	gccatgtgag	aacgtaacgt	aacaaaata	atataaattc	ctctgagtat	1140
tctgttaaat	cctgtgttcg	aactctcaac	ctctgttaag	ggatttgtgt	ctgatcctct	1200
gtagtagtgt	aagattccca	atttgtatgt	tcaaaataaa	aatctagatt	gtggcatttc	1260
ttctaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaa				1284
<210>	6					
<211>	1257					
<212>	DNA					
<213>	Ipomoea batatas					
<400>	6					
gttttcagca	ctgttaagcc	ttagtttca	gagagtataa	cagcttaagt	tagcaacaa	60
tggctaggc	aatcagttgt	ttcttcatgg	ccattactt	tcttgctttt	gcaccggtt	120
ccctctgtt	caagggttat	ggtggtagcc	tgtatccaca	gtattacgag	aagtcgtgcc	180
cgagggcgct	agagattgtc	aggcttgagg	ttgcgaaagc	cgtggctaaa	gaagcacgaa	240
tggctgctc	tttgatcagg	ctctccttcc	atgactgtt	tgtccagggg	tgtgtatgcat	300
ctatacttct	agacagcggt	aatggcataa	ccagcgagaa	gaattctaacc	ccaaacacagaa	360
actctgctcg	tgggtttgat	gtgattgatg	atataaaggc	tgccttgag	aaggagtgcc	420
ctcaaactgt	ttcttgcgt	gatattatgc	aacttgcgtc	caggattct	acacatctga	480
gtgggtggacc	attctggaa	gtcccagtag	gaaggaaaga	ctccagaagt	gccagcctga	540
gtggctccaa	caacaacatc	cctgcaccaa	acagcacatt	ccaaaccatt	cttaacacagg	600
tcaagaacca	aggccttgat	cttggtgatc	tttggcatt	atctggagat	cacacaattg	660
ggaactcaag	atgtgtcagc	ttcagacaaa	ggctttacaa	ccaaagctggg	aacaaccaac	720
cagactctac	cttgatcag	tactatgtc	ctcagctgcg	caacaggtgc	ccgagatccg	780
ggggcgactc	gaacctgttt	ttcttggatt	tttgagccc	aacaaagttt	gacaactcct	840
acttcaagct	cttggtgca	aacaaggac	ttctcaactc	agaccaagtt	ctgaccacca	900
agaatgaagc	atcattgcag	ctggtaaag	cataatgcaga	gaacaatgag	ctttccttc	960
aacatttcgc	ctcgccatg	attaagatgg	ccaaacatttc	acctctcact	ggttccaatg	1020
gagaaatcag	gaagaattgc	aggaagatca	actcttaata	caaataactat	aaactcaaca	1080
gagaggcatg	cagcagaaat	aatttaatat	tttggtgtt	ggttgtcatg	tattgtcctc	1140
ttttttccat	tttcccagct	tttcagtgtc	tgtatccct	atttttgtat	gattttgttt	1200
tgaatggaaa	gttttgtttt	ttaaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1257
<210>	7					
<211>	1263					
<212>	DNA					
<213>	Ipomoea batatas					
<400>	7					
gttttcagtt	ctgttaagcc	ttagtttcc	agagagtata	acagcttaag	tttgacaaca	60
atggctgtgt	caatcaggtg	tttcttcatg	gccattactc	ttcttgcttt	tgaccgctt	120

tcgctctgtc acaagggcta tggtggttgt ggtggtagta gtctgtatcc acagtattac	180
gagaagtcgt gcccacgagc actagagatt gtcaggtttg aagttgcgaa agccgtggct	240
aaagaagcaa gaatggctgc ttctttgtc aggctcgct ttcatgactg tttgttcaag	300
gatgtgtatg catctatact tctagacagc ggtaatggca taacaagcga gaagaattct	360
aaccccaaca gaaaatctgc tcgcgggtt aacgtgattt atgacatcaa agtgccttg	420
gagaaggagt gcccacac ggttctgtc gctgatatta tgcaagttgc tgccaggat	480
tctacacatc tgagtggtag accattctgg gaagttccat taggaaggaa agactccagg	540
agtgcaccc tgagtggtc caacaacaac atccctgcac caaacaacac ctccaaacc	600
atccttacca agttcaagcg ccagggcctt gatcttggat atcttggc attatctggg	660
agccacacaa ttggaaattc aagatgtacc agtttcagac agaggctta caaccaatct	720
gaaaaacagca aaccagactc taccttggat cagtaactatg ctgctcagct ggcacacagg	780
tgccccgagat ccgggggta tcagaacctg ttttctgg acttcgttag cccgaaaaag	840
ttcgacaaca gctacttcaa gctcttggat gcaacaagg gacttctcaa ctcagaccaa	900
gttctgacca ccaagagtga agcatcattt cagctggtag aagcatatgc agagaacaat	960
gagcttttcc ttcaacattt cgcctcgcc atgatcaaga tggccaacat ttgcctctc	1020
actggctcca agggagaaat caggaagaat tgcaggaaga tcaactcttata atacaataac	1080
cataaactcc tcactgaaac agcagaataa ataaactgtg tcttgggtgt catgtattgt	1140
cctctttcc ccattttcc agcttttgag tgtctgtat ctgtatttcc tcattttttt	1200
gatcggtttg tgttgaata tacannaagt attacataaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1260
aaa	1263
<210> 8	
<211> 1290	
<212> DNA	
<213> Ipomoea batatas	
<400> 8	
caacatcgta tagtagctt taaggttgc agagaaatta aggttcaatg gcgggttctg	60
ttaaggctt gactgctgtt ttgttgtgt ttttgtgtc ttttttttttgc ttttctgtc	120
agctttcgcc tgggtttac tcgaaatcat gccaaagct tttccagaca gtcaactctg	180
ttgtgcggc tgcaatccag aaagaggctc gcatgggcgc ctctctcctt cgccctttct	240
tccatgactg ctttgtcaat ggggtgtatg gatcaattt cttggacgat acgtttccct	300
tcaccggaga gaaaagggcg gctcccaact tccagtccgc tcgtgggtt gaggtcattt	360
acccaaattaa gtccgctgtc gagaaagttt gccttggagt tttgttgc gctgacattt	420
tggccatttc ttctcggtac tctactgtt cacttggagg gcctagttgg aatgtgaaac	480
ttgggagaag agatgctagg actgcaagcc aaggcagcagc caacaacagc attcctgctc	540
ccacttctaa cctcaatcgc ctcatttca gcttcagtc ttttttttttgc tctaccaacg	600
atatgggtgt tttatcagge tcacacacaa ttggacaggg ccgggtgcacg aacttcaggg	660
caagaatata caacgagtca aacatagact catcctttgc ccaatccagg aaggcaact	720
gccccagagc aagtgggtcc ggggacaaca acttggcccc actcgacctc caaaccacaa	780
taaagttga caacaactac tacgtcaacc tcgtcaacaa aaagggtctt ctccactccg	840
accaacagct cttcaatggc gtttcaacag actcaactgt gagaggatac agcacaaacc	900
catcaaaattt caaatcagat ttgcgcaggccg ccatgatcaa gatgggtgtatcaagccac	960
tcactggaa caatggagag atcaggagaactt actgcaggag aaggaactaa ttttttttttgc	1020
aatatatatac taccaaaatc ggatcaatcc ggcttattt aattactata attgtctgtt	1080
atggagattt ctgcagctt agtttggat tcttggat ttttttttttgc ttttttttttgc	1140
cattatttggaa agtgggtgaca gcaagggtcag aggataattt ttcttggat taaagttgtt	1200
agtgtgttatg aattatgtt tggaggttt tctatataaa aaatccctaa taaaagtcct	1260
catatttctt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1290
<210> 9	
<211> 356	
<212> PRT	
<213> Ipomoea batatas	
<400> 9	

Met Ala Ser Phe Val Thr Arg Leu Ser Leu Ala Leu Ser Phe Ile Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Ala Leu Ala Gly Phe Ser Ile Tyr Gln Asn Thr His Thr Ala Met  
 20 25 30  
 Lys Gly Gln Leu Lys Leu Thr Pro Lys Trp Leu Leu Asp Asn Thr Leu  
 35 40 45  
 Glu Ser Ser Val Ala Asp Val Leu Ser Leu Arg Leu Gly Ile Ser Ser  
 50 55 60  
 Gly Lys Leu Ser Asp Glu Asp Cys Ile Phe Ser Ala Val Lys Glu Val  
 65 70 75 80  
 Val Asp Ala Ala Ile Asp Ala Glu Thr Arg Met Gly Ala Ser Leu Ile  
 85 90 95  
 Arg Leu Phe Phe His Asp Trp Phe Val Asp Gly Cys Asp Ala Gly Leu  
 100 105 110  
 Leu Leu Asn Asp Thr Pro Thr Phe Thr Arg Glu Gln Thr Ala Gly Gly  
 115 120 125  
 Asn Asn Asn Ser Val Thr Gly Phe Glu Val Ile Gln Gln Ala Lys Glu  
 130 135 140  
 Asn Val Ile Thr Lys Cys Pro Tyr Ile Gln Val Ser Cys Ala Asp Ile  
 145 150 155 160  
 Leu Ser Ile Ala Ala Arg Asp Ser Phe Gln Arg Phe Thr Gly Glu Thr  
 165 170 175  
 Tyr Thr Val Thr Leu Gly Arg Leu Asp Ala Arg Thr Ala Asn Leu Thr  
 180 185 190  
 Gly Ala Asn Thr Gln Leu Val Gly Pro Asn Glu Glu Leu Ala Ser Gln  
 195 200 205  
 Val Glu Lys Phe Ala Ala Lys Gly Phe Ser Glu Thr Glu Leu Val Ala  
 210 215 220  
 Leu Leu Gly Val His Thr Val Gly Phe Ser Arg Cys Pro Leu Leu Cys  
 225 230 235 240  
 Val Pro Ile Phe Ile Asn Pro Ala Arg Ala Ser Thr Leu Gln Cys Asn  
 245 250 255  
 Cys Pro Val Ser Pro Asp Asp Thr Gly Leu Val Gly Leu Asp Pro Thr  
 260 265 270  
 Pro Leu Thr Trp Asp Gln Ser Phe Tyr Ser Asp Val Ala Asn Gly Gln  
 275 280 285  
 Gly Leu Leu Phe Ser Asp Asn Glu Leu Met Asn Ser Asn Thr Thr Ser  
 290 295 300  
 Ala Ala Val Arg Arg Tyr Arg Asp Glu Met Asp Ala Phe Leu Ala Asp  
 305 310 315 320  
 Phe Ala Ala Ala Met Val Lys Met Ser Leu Leu Pro Pro Ser Pro Gly  
 325 330 335  
 Val Glu Leu Glu Ile Arg Glu Val Cys Ser Glu Val Asn Ala Asn Thr  
 340 345 350  
 Val Ala Ser Met  
 355  
 <210> 10  
 <211> 327  
 <212> PRT  
 <213> Ipomoea batatas  
 <400> 10  
 Met Ala Ser Phe Ser Ser Leu Leu Ala Met Ala Leu Ala Ile Ser Ile

1	5	10	15												
Phe	Leu	Ser	His	Ser	Asn	Ala	Gln	Leu	Ser	Ser	Thr	Phe	Tyr	Ser	Thr
			20					25				30			
Thr	Cys	Pro	Asn	Val	Ser	Ser	Ile	Val	Ser	Thr	Val	Ile	Gln	Gln	Ala
				35				40				45			
Leu	Gln	Asn	Asp	Ala	Arg	Ile	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Arg	Leu	His	Phe
				50			55				60				
His	Asp	Cys	Phe	Val	Asn	Gly	Cys	Asp	Gly	Ser	Ile	Leu	Leu	Asp	Asn
				65			70				75				80
Asn	Gly	Thr	Thr	Ile	Val	Ser	Glu	Lys	Asp	Ala	Ala	Pro	Asn	Asn	Asn
				85			90				95				
Ser	Ala	Arg	Gly	Phe	Asp	Val	Val	Asp	Asn	Ile	Lys	Thr	Ala	Val	Glu
				100			105				110				
Asn	Ala	Cys	Pro	Gly	Val	Val	Ser	Cys	Ala	Asp	Ile	Leu	Ala	Leu	Ala
				115			120				125				
Ser	Glu	Ser	Ala	Val	Ser	Leu	Ala	Ser	Gly	Pro	Ser	Trp	Asn	Val	Leu
				130			135				140				
Leu	Gly	Arg	Arg	Asp	Ser	Arg	Thr	Ala	Asn	Gln	Ala	Gly	Ala	Asn	Thr
				145			150				155				160
Ser	Ile	Pro	Ala	Pro	Phe	Glu	Ser	Leu	Ser	Asn	Ile	Thr	Thr	Lys	Phe
				165			170				175				
Ser	Asn	Val	Gly	Leu	Asn	Val	Asn	Asp	Leu	Val	Ala	Leu	Ser	Gly	Ala
				180			185				190				
His	Thr	Phe	Gly	Arg	Ala	Gln	Cys	Arg	Thr	Phe	Ser	Asn	Arg	Leu	Phe
				195			200				205				
Asn	Phe	Ser	Asn	Thr	Gly	Asn	Pro	Asp	Ser	His	Leu	Lys	His	Asn	Leu
				210			215				220				
Leu	Ser	Thr	Leu	Gln	Gln	Val	Cys	Pro	Gln	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Thr
				225			230				235				240
Val	Thr	Asn	Leu	Asp	Pro	Thr	Thr	Pro	Asp	Thr	Phe	Asp	Ser	Ser	Tyr
				245			250				255				
Phe	Ser	Asn	Leu	Gln	Asn	Asn	Arg	Gly	Leu	Leu	Gln	Ser	Asp	Gln	Glu
				260			265				270				
Leu	Phe	Ser	Thr	Ser	Gly	Ala	Ala	Thr	Ile	Ala	Ile	Val	Asn	Ser	Phe
				275			280				285				
Ser	Ala	Asn	Gln	Thr	Ala	Phe	Phe	Gln	Ser	Phe	Val	Gln	Ser	Met	Ile
				290			295				300				
Asn	Met	Gly	Asn	Ile	Ser	Pro	Leu	Thr	Gly	Thr	Ser	Gly	Glu	Ile	Arg
				305			310				315				320
Leu	Asn	Cys	Arg	Arg	Pro	Asn									
				325											
<210>	11														
<211>	353														
<212>	PRT														
<213>	Ipomoea batatas														
<400>	11														
Met	Ala	Ser	Phe	Ala	Thr	Lys	Leu	Ser	Leu	Ala	Leu	Ser	Leu	Leu	Ala
				1		5				10				15	
Leu	Val	Leu	Ala	Gly	Tyr	Ser	Ile	Tyr	Gln	Asn	Thr	Tyr	Ser	Ala	Ile
				20			25				30				
Asn	Gly	Thr	Glu	Leu	Gln	Leu	Ile	Pro	Thr	Trp	Leu	Asp	Glu	Thr	Leu
				35			40				45				

Glu Ser Ala Asn Ile Leu Arg Ala Leu Gly Leu Gly Lys Ser Ser Ser  
     50                     55                     60  
 Gly Met Leu Ser Asp Glu Ala Cys Val Phe Ser Ala Val Lys Glu Ile  
     65                     70                     75                     80  
 Val Glu Ala Ala Ile Thr Asn Glu Thr Arg Met Gly Ala Ser Leu Ile  
     85                     90                     95  
 Arg Leu Phe Phe His Asp Cys Phe Val Asp Gly Cys Asp Gly Gly Ile  
     100                   105                     110  
 Leu Leu Asn Ala Thr Asn Gly Glu Gln Ser Ala Pro Ala Asn Ala Asn  
     115                   120                     125  
 Ser Val Arg Gly Phe Glu Val Ile Glu Arg Ala Lys Gln Asn Ala Lys  
     130                   135                     140  
 Ser Lys Cys Ser Asp Thr Pro Val Ser Cys Ala Asp Val Leu Ala Ile  
     145                   150                     155                     160  
 Ala Ala Arg Asp Ser Val Val Lys Leu Gly Gly Gln Thr Tyr Thr Val  
     165                   170                     175  
 Asn Leu Gly Arg Arg Asp Ala Arg Ser Phe Asn Leu Thr Gly Ala Asn  
     180                   185                     190  
 Asn Gln Leu Pro Ala Pro Phe Asp Asp Leu Ala Thr Gln Thr Arg Lys  
     195                   200                     205  
 Phe Ala Asp Lys Gly Phe Asn Gln Thr Glu Met Val Ala Leu Ala Gly  
     210                   215                     220  
 Ala His Thr Val Gly Phe Ala Arg Cys Ala Val Leu Cys Ser Ser Asn  
     225                   230                     235                     240  
 Asn Leu Asn Gln Ala Arg Asn Ser Thr Leu Gln Cys Thr Cys Pro Val  
     245                   250                     255  
 Ala Ala Gly Asp Ala Gly Leu Val Gly Leu Asp Pro Thr Pro Ser Thr  
     260                   265                     270  
 Met Asp Thr Arg Tyr Phe Arg Asp Ile Val Asp Gly Gln Gly Leu Leu  
     275                   280                     285  
 Phe Ser Asp Gln Val Leu Leu Asn Gly Thr Thr Thr Ala Ala Val  
     290                   295                     300  
 Arg Arg Tyr Arg Asp Gly Thr Gly Ala Phe Leu Ser Asp Phe Ala Ala  
     305                   310                     315                     320  
 Ala Met Val Lys Met Gly Asn Leu Ala Pro Ser Ala Gly Val Gln Leu  
     325                   330                     335  
 Glu Ile Arg Asp Val Cys Ser Ile Val Asn Pro Thr Ser Val Ala Ala  
     340                   345                     350  
 Met  
 <210>   12  
 <211>   332  
 <212>   PRT  
 <213>   Ipomoea batatas  
 <400>   12  
 Met Ala Arg Ser Ile Ser Cys Phe Phe Met Ala Ile Thr Leu Leu Ala  
     1                     5                     10                     15  
 Phe Ala Pro Val Ser Leu Cys Tyr Lys Gly Tyr Gly Gly Ser Leu Tyr  
     20                   25                     30  
 Pro Gln Tyr Tyr Glu Lys Ser Cys Pro Arg Ala Leu Glu Ile Val Arg  
     35                   40                     45  
 Ser Glu Val Ala Lys Ala Val Ala Lys Glu Ala Arg Met Ala Ala Ser  
     50                   55                     60

Leu Ile Arg Leu Ser Phe His Asp Cys Phe Val Gln Gly Cys Asp Ala  
   65                      70                      75                      80  
 Ser Ile Leu Leu Asp Ser Gly Asn Gly Ile Thr Ser Glu Lys Asn Ser  
   85                      90                      95  
 Asn Pro Asn Arg Asn Ser Ala Arg Gly Phe Asp Val Ile Asp Asp Ile  
   100                     105                     110  
 Lys Ala Ala Leu Glu Lys Glu Cys Pro Gln Thr Val Ser Cys Ala Asp  
   115                     120                     125  
 Ile Met Gln Leu Ala Ala Arg Asp Ser Thr His Leu Ser Gly Gly Pro  
   130                     135                     140  
 Phe Trp Glu Val Pro Val Gly Arg Lys Asp Ser Arg Ser Ala Ser Leu  
   145                     150                     155                     160  
 Ser Gly Ser Asn Asn Asn Ile Pro Ala Pro Asn Ser Thr Phe Gln Thr  
   165                     170                     175  
 Ile Leu Asn Arg Phe Lys Asn Gln Gly Leu Asp Leu Val Asp Leu Val  
   180                     185                     190  
 Ala Leu Ser Gly Ser His Thr Ile Gly Asn Ser Arg Cys Val Ser Phe  
   195                     200                     205  
 Arg Gln Arg Leu Tyr Asn Gln Ala Gly Asn Asn Gln Pro Asp Ser Thr  
   210                     215                     220  
 Leu Asp Gln Tyr Tyr Ala Ala Gln Leu Arg Asn Arg Cys Pro Arg Ser  
   225                     230                     235                     240  
 Gly Gly Asp Ser Asn Leu Phe Phe Leu Asp Phe Val Ser Pro Thr Lys  
   245                     250                     255  
 Phe Asp Asn Ser Tyr Phe Lys Leu Leu Ala Asn Lys Gly Leu Leu  
   260                     265                     270  
 Asn Ser Asp Gln Val Leu Thr Thr Lys Asn Glu Ala Ser Leu Gln Leu  
   275                     280                     285  
 Val Lys Ala Tyr Ala Glu Asn Asn Glu Leu Phe Leu Gln His Phe Ala  
   290                     295                     300  
 Ser Ser Met Ile Lys Met Ala Asn Ile Ser Pro Leu Thr Gly Ser Asn  
   305                     310                     315                     320  
 Gly Glu Ile Arg Lys Asn Cys Arg Lys Ile Asn Ser  
   325                     330  
 <210>    13  
 <211>    336  
 <212>    PRT  
 <213>    Ipomoea batatas  
 <400>    13  
 Met Ser Val Ser Ile Arg Cys Phe Phe Met Ala Ile Thr Leu Leu Ala  
   1                5                10                15  
 Phe Ala Pro Leu Ser Leu Cys His Lys Gly Tyr Gly Gly Gly Gly  
   20                25                30  
 Ser Ser Leu Tyr Pro Gln Tyr Tyr Glu Lys Ser Cys Pro Arg Ala Leu  
   35                40                45  
 Glu Ile Val Arg Phe Glu Val Ala Lys Ala Val Ala Lys Glu Ala Arg  
   50                55                60  
 Met Ala Ala Ser Leu Leu Arg Leu Ala Phe His Asp Cys Phe Val Gln  
   65                70                75                80  
 Gly Cys Asp Ala Ser Ile Leu Leu Asp Ser Gly Asn Gly Ile Thr Ser  
   85                90                95  
 Glu Lys Asn Ser Asn Pro Asn Arg Lys Ser Ala Arg Gly Phe Asn Val

	100	105	110
Ile Asp Asp Ile Lys Ala Ala Leu Glu Lys Glu Cys Pro His Thr Val			
115	120	125	
Ser Cys Ala Asp Ile Met Gln Leu Ala Ala Arg Asp Ser Thr His Leu			
130	135	140	
Ser Gly Gly Pro Phe Trp Glu Val Pro Leu Gly Arg Lys Asp Ser Arg			
145	150	155	160
Ser Ala Ser Leu Ser Gly Ser Asn Asn Asn Ile Pro Ala Pro Asn Asn			
165	170	175	
Thr Phe Gln Thr Ile Leu Thr Lys Phe Lys Arg Gln Gly Leu Asp Leu			
180	185	190	
Val Asp Leu Val Ala Leu Ser Gly Ser His Thr Ile Gly Asn Ser Arg			
195	200	205	
Cys Thr Ser Phe Arg Gln Arg Leu Tyr Asn Gln Ser Gly Asn Ser Lys			
210	215	220	
Pro Asp Ser Thr Leu Asp Gln Tyr Tyr Ala Ala Gln Leu Arg Asn Arg			
225	230	235	240
Cys Pro Arg Ser Gly Gly Asp Gln Asn Leu Phe Phe Leu Asp Phe Val			
245	250	255	
Ser Pro Lys Lys Phe Asp Asn Ser Tyr Phe Lys Leu Leu Leu Ala Asn			
260	265	270	
Lys Gly Leu Leu Asn Ser Asp Gln Val Leu Thr Thr Lys Ser Glu Ala			
275	280	285	
Ser Leu Gln Leu Val Lys Ala Tyr Ala Glu Asn Asn Glu Leu Phe Leu			
290	295	300	
Gln His Phe Ala Ser Ser Met Ile Lys Met Ala Asn Ile Ser Pro Leu			
305	310	315	320
Thr Gly Ser Lys Gly Glu Ile Arg Lys Asn Cys Arg Lys Ile Asn Ser			
325	330	335	
<210> 14			
<211> 321			
<212> PRT			
<213> Ipomoea batatas			
<400> 14			
Met Ala Val Ser Val Val Lys Ala Leu Thr Ala Val Leu Leu Cys Val			
1	5	10	15
Leu Val Leu Val Gly Gly Cys Ser Ala Gln Leu Ser Pro Gly Phe Tyr			
20	25	30	
Ser Lys Ser Cys Pro Lys Leu Phe Gln Thr Val Asn Ser Val Val Arg			
35	40	45	
Ser Ala Ile Gln Lys Glu Ala Arg Met Gly Ala Ser Leu Leu Arg Leu			
50	55	60	
Phe Phe His Asp Cys Phe Val Asn Gly Cys Asp Gly Ser Ile Leu Leu			
65	70	75	80
Asp Asp Thr Ser Ser Phe Thr Gly Glu Lys Arg Ala Ala Pro Asn Phe			
85	90	95	
Gln Ser Ala Arg Gly Phe Glu Val Ile Asp Gln Ile Lys Ser Ala Val			
100	105	110	
Glu Lys Val Cys Pro Gly Val Val Ser Cys Ala Asp Ile Leu Ala Ile			
115	120	125	
Ala Ser Arg Asp Ser Thr Val Thr Leu Gly Gly Pro Ser Trp Asn Val			
130	135	140	

Lys Leu Gly Arg Arg Asp Ala Arg Thr Ala Ser Gln Ala Ala Ala Asn  
 145 150 155 160  
 Asn Ser Ile Pro Ala Pro Thr Ser Asn Leu Asn Arg Leu Ile Ser Ser  
 165 170 175  
 Phe Ser Ala Val Gly Leu Ser Thr Asn Asp Met Val Val Leu Ser Gly  
 180 185 190  
 Ser His Thr Ile Gly Gln Ala Arg Cys Thr Asn Phe Arg Ala Arg Ile  
 195 200 205  
 Tyr Asn Glu Ser Asn Ile Asp Ser Ser Phe Ala Gln Ser Arg Lys Gly  
 210 215 220  
 Asn Cys Pro Arg Ala Ser Gly Ser Gly Asp Asn Asn Leu Ala Pro Leu  
 225 230 235 240  
 Asp Leu Gln Thr Pro Ile Lys Phe Asp Asn Asn Tyr Tyr Val Asn Leu  
 245 250 255  
 Val Asn Lys Lys Gly Leu Leu His Ser Asp Gln Gln Leu Phe Asn Gly  
 260 265 270  
 Val Ser Thr Asp Ser Thr Val Arg Gly Tyr Ser Thr Asn Pro Ser Lys  
 275 280 285  
 Phe Lys Ser Asp Phe Ala Ala Ala Met Ile Lys Met Gly Asp Ile Lys  
 290 295 300  
 Pro Leu Thr Gly Asn Asn Gly Glu Ile Arg Lys Asn Cys Arg Arg Arg  
 305 310 315 320  
 Asn  
 <210> 15  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> forward primer for swpa4 gene  
 <400> 15  
 cagcgagggtg aatgccaaca 20  
 <210> 16  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> reverse primer for swpa4 gene  
 <400> 16  
 ttcagtaata caagttttgt 20  
 <210> 17  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> forward primer for swpa5 gene  
 <400> 17  
 tccgtgagtg aaatctgtt 19  
 <210> 18  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>

<223>	reverse primer for swpa5 gene	
<400>	18	
aaaaaatgag	gtactgaaaa taaa	24
<210>	19	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	forward primer for swpa6 gene	
<400>	19	
cgtaacgtaa	caaaaataat a	21
<210>	20	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	reverse primer for swpa6 gene	
<400>	20	
atcttagattt	ttatttgaa cat	23
<210>	21	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	forward primer for swpb1 gene	
<400>	21	
gatcaactct	taatacaaat aca	23
<210>	22	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	reverse primer for swpb1 gene	
<400>	22	
aaaacaaaaat	catcaaaaa	19
<210>	23	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	forward primer for swpb2 gene	
<400>	23	
gatcaactct	taatacaaat a	21
<210>	24	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	reverse primer for swpb2 gene	
<400>	24	
aaaaatgtgg	aaatacagat	20
<210>	25	

<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> forward primer for swpb3 gene  
<400> 25  
gaagaactgc aggagaagga actaat 26  
<210> 26  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> reverse primer for swpb3 gene  
<400> 26  
gaaaaattat cctctgacc 19